



COLLECTIVE
MONOGRAPH

MEDICAL SCIENCES:
DEVELOPMENT PROSPECTS
IN COUNTRIES OF EUROPE
AT THE BEGINNING
OF THE THIRD
MILLENNIUM

STALOWA WOLA,
REPUBLIC OF POLAND

РІВЕНЬ АНТИМІКРОБНОГО ПЕПТИДУ КАТЕЛІЦИДИНУ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

Дудник В. М., Демянишина В. В.

ВСТУП

Муковісцидоз (МВ) є одним із найпоширеніших аутосомно-рецесивних захворювань, що зумовлене мутацією гену CFTR (трансмембранний регуляторний білок муковісцидозу) і характеризується клінічним поліморфізмом.

МВ поширений серед усього населення Землі, але найчастіше зустрічається у осіб європеїдної раси. Найбільша захворюваність спостерігається в таких країнах, як Ірландія (1:1800), Шотландія (1:1984), Швейцарія (1:2000), Франція (1:2350). Серед населення країн Азії частота МВ складає 1:40000-100000 (Індія), 1:100000-350000 (Японія). За даними щорічного звіту The European Cystic Fibrosis Society Patient Registry (ECFSРR) за 2014 рік, у 26 європейських країнах, у тому числі і в Україні, зареєстровано 35 582 пацієнтів, хворих на МВ, з яких 48,2% дітей¹. В США на 2015 рік згідно з щорічним звітом Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry проживає 28 983 хворих на МВ, серед яких 48,4% дитячого населення².

Станом на 2016 рік за офіційною статистикою МОЗ України на обліку перебуває 674 дитини. За результатами неонатального скринінгу на МВ 2013–2014 рр., середня частота в Україні становила 1:8400. Точну частоту МВ в Україні складно визначити через припинення програми масового неонатального скринінгу в 2015 році³.

Згідно з даними ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» в Україні гетерозиготним носієм мутацій гену CFTR є кожний 29 житель. За підрахунками, в Україні мало б проживати від 1 700 до 4 000 хворих на муковісцидоз, отже, переважна більшість пацієнтів не виявлена⁴.

¹ Cystic Fibrosis in Europe – Facts and Figures. The European Cystic Fibrosis Society. 2015.

² Patient registry annual data report. Cystic Fibrosis Foundation. 2016.

³ Makukh H., Křenková P., Tyrkus M. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: Genotype–phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010. № 9, p. 371–375.

⁴ Makukh H., Křenková P., Tyrkus M. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: Genotype–phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010. № 9, p. 371–375.

Клінічні прояви та важкість хвороби варіюють залежно від виду мутації, що спричинила хворобу, віку пацієнтів та багатьох інших умов. Дієвих методів лікування МВ немає, але сучасні дослідження ведуть до покращення медикаментозного супроводу таких хворих, який допомагає покращити якість та подовжити тривалість життя. Сьогодні у розвинених країнах медіана тривалості життя хворих на МВ збільшилась. Згідно з даними Національного Інституту Здор'я США (NIH) за 2016 рік середня тривалість життя пацієнтів, хворих на МВ, становила більше 37 років⁵. Щорічний звіт UK Cystic Fibrosis Registry 2015 року показав, що середній очікуваний вік хворих на МВ в Британії становить 45,1 рік, це означає, що половина зареєстрованих хворих житимуть більше за вказаний вік, але інша половина може померти, не досягнувши цього показника⁶.

Це захворювання зберігає свою високу медико-соціальну значущість, що пов'язано із низькою тривалістю життя хворих, раннім формуванням ускладнень, ранньою інвалідизацією, проблемами своєчасної діагностики, необхідністю постійного диспансерного спостереження, складнощами лікування та високим рівнем смертності.

З віком у хворих виникають такі ускладнення, як дихальна недостатність, легенева гіпертензія, серцева недостатність, зниження нутритивного статусу, цироз печінки, цукровий діабет, печінкова недостатність, кишкова непрохідність. Для МВ характерний прогресуючий перебіг, часті загострення, зумовлені активністю інфекційних агентів (*Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia ceracia*). Прогресування легеневої та серцевої недостатності є найчастішою причиною смерті хворих (95%). Серед інших причин в економічно розвинутих країнах виділяють: ускладнення після трансплантації органів (12%), захворювання печінки та печінкова недостатність (2,3%), травми (2,1%), сугідид (0,8%), інші (1,3%).

Прогноз даного захворювання більшою мірою залежить від наявності хронічної інфекції і персистуючого запалення дихальних шляхів. За останнє десятиріччя розроблено багато терапевтичних програм, в тому числі і антибіотикотерапії, що покращують прогноз

⁵ Cystic Fibrosis Life Expectancy. Cystic fibrosis news today. 2016. URL: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/cystic-fibrosis-research/>.

⁶ UK Cystic Fibrosis Registry 2015 Annual Data Report. 2016.

для хворих. Але проблема антибіотикорезистентності більшості штамів, висіяних з респіраторного тракту хворих на МВ, залишається. За окремими даними, 85,2% штамів мають резистентність до 1 і більше бактеріцидних засобів.

Хоча проблемі патогенезу захворювання приділено багато уваги, залишаються невизначеними механізми генетичних, імунних та імунорегуляторних порушень, що сприяють прогресуванню захворювання у дітей.

Враховуючи імунний генез поліорганного ураження при МВ, подальші перспективи вивчення пов'язані з переводом досліджень на молекулярно-генетичний рівень, пошуком і детальним дослідженням механізмів специфічного та неспецифічного захисту організму, вплив на які покращить прогноз та якість життя хворих.

Роль антимікробних пептидів у захисті респіраторного тракту

у здорових людей та у хворих на муковісцидоз

За останнє десятиліття інтерес до системи захисту дихальних шляхів значно зріс. Важлива роль у цій системі відводиться епітелію дихальних шляхів, на поверхні якого відбувається взаємодія між зовнішніми агентами та системою захисту організму. Епітеліальний шар дихальних шляхів є першою точкою контакту між внутрішнім середовищем організму та речовинами, що вдихаються з повітрям. Це перший бар'єр, що стоїть на захисті організму⁷, будучи механічним бар'єром між зовнішнім та внутрішнім середовищем, здійснює циліарний кліренс, забезпечує відповідну гідратацію поверхневого шару, регулює транспорт іонів та рідини, секретію слизу залозами⁸. Крім функції неспецифічного імунітету, епітеліальний шар забезпечує захист проти мікроорганізмів та стимулює відповідь адаптивного імунітету.

Епітеліальний шар дихальних шляхів є першою точкою контакту між внутрішнім середовищем організму та речовин, що вдихаються з повітрям. Він сприймає бактеріальний вплив і відповідає, активуючи захисні механізми організму. Ця реакція складається із вивільнення так

званих антимікробних пептидів в просвіт дихальних шляхів і вивільнення хемокінів і цитокінів в підслизову, що ініціює запальну реакцію. Ця запальна реакція включає рекрутинг фагоцитів, які елімінують мікроорганізми, що не були очищені війками епітелію безпосередньо, і дендритні клітини та лімфоцити, які допомагають підвищити адаптивну імунну відповідь^{9,10}.

Епітеліальні клітини дихальних шляхів секретують велику кількість молекул, що залучаються до запальних та імунних процесів. Деякі з секретованих речовин мають пряму антимікробну дію та діють як ендогенні антибіотики¹¹. Ці молекули включають катіонні антимікробні пептиди, як, наприклад, b-дефензини і кателіцидини (LL-37), а також і більш антимікробні протеїни, як, наприклад, лізозим, лактоферин і інгібітор секреторної лейкоцитарної протеїнази. Ці молекули здійснюють мікробцидну активність або інгібують ріст мікроорганізмів, що вдихаються, доки їх не елімінує мукоциліарний апарат, завербовані фагоцити та/або не розвинеться відповідь адаптивного імунітету.

Антимікробні пептиди (АМП) – ефекторні молекули вродженої імунної системи. Нещодавно було визнано, що вони мають множинні ефекти та, окрім їх антимікробної функції, здійснюють протигрибовий, протипаразитарний та противірусний захист. АМП залучаються в запальний процес не лише як ендогенні антибіотики, але і як медіатори запалення. Дефензини і кателіцидини є головними сім'ями АМП, які експресуються в дихальному тракті. Антимікробні пептиди в людській легенях здебільшого продукуються і секретуються епітеліальними і фагоцитарними клітинами¹².

Класичний механізм дії АМП включає їх здатність спричиняти ушкодження клітинної мембрани. АМП можуть взаємодіяти з мікроорганізмами за допомогою електростатичних сил між їх

⁹ Cystic Fibrosis in Europe – Facts and Figures. The European Cystic Fibrosis Society, 2015.

¹⁰ Patient registry annual data report. Cystic Fibrosis Foundation, 2016.

¹¹ Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, 2000. №1. p. 141–150.

¹² Bals R., Hiemstra P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European respiratory journal*, 2004. №23. p. 327–333.

позитивно зарядженими амінокислотними залишками і негативно зарядженими часточками, які виставлені на клітинних поверхнях.¹³

Були запропоновані кілька моделей, які пояснюють механізм руйнування мембран антимікробними пептидами, як, наприклад, модель «бочок», тороїдальна і «килимкова» моделі.¹⁴

АМП-контрольована мікробна смерть може викликатися іншими механізмами, на додаток до мембранного руйнування, що завершується клітинним лізисом. Багато фактів вказують на те, що деякі АМП можуть взаємодіяти із внутрішньоклітинними цілями та спричиняти клітинні ушкодження, як, наприклад, інгібування ДНК, РНК і синтезу білків. Окрім того, один пептид може діяти на кілька клітинних цілей.^{15,16}

Сьогодні виконано багато робіт, де досліджувалися антимікробні пептиди (АМП). Визначено, що ці речовини є ланкою вродженого імунітету і рівень АМП можна розцінити як маркер системної активації при інфекційних, аутоімунних та запальних захворюваннях. АМП залучаються в запальний процес не лише як ендогенні антибіотики, але і як медіатори запалення та в дихальних шляхах в основному продукуються і секретиються епітеліальними і фагоцитарними клітинами.

Експресія і секреція генів антимікробних пептидів жорстко регулюється. Експресія збільшується внаслідок контакту клітин із мікробними продуктами або прозапальними медіаторами. Вроджена імунна система сприймає молекулярні образи, користуючись рецепторами розпізнавання образів (PRR). Клітини системи вродженого імунітету, у тому числі фагоцити, дендритні клітини і епітеліальні клітини, користуються PRR, щоб зв'язати молекулярні образи, які присутні на мікроорганізмах.^{17,18} Образ-розпізнаючі

молекули можуть бути присутніми у виділених і циркулювати в розчинній формі, як, наприклад, манан-зв'язуючий лектин, або вони можуть бути трансмембранними молекулами, що опосередковують пряму клітинну відповідь на мікробний вплив.¹⁹

Toll-like рецептори (TLR) – це найбільш вивчена група PRR.¹⁹ Більшість TLR розпізнають бактерійні патерни, так звані патерн-зв'язуючі молекулярні образи (PAMP), (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 і TLR9, TLR10, TLR11). Наприклад, TLR4 чутливий до ліпополісахаридів (ЛПС), TLR5 – до флагеліну, TLR9 – до CpG олігонуклеотидів і TLR11 уропатогенні бактерії та/або профілін протозойних. Вірусні PAMP розпізнаються через TLR3 (дволанцюгова РНК, dsРНК), TLR7 і TLR8 (одноланцюгова РНК, ssРНК). TLR експресуються різноманітними імунними і структурними клітинами, у тому числі моноцитами/макрофагами, дендритними клітинами, лімфоцитами, ендотеліальними клітинами, міоцитами, епітеліальними клітинами, нейтрофілами тощо.²⁰

Клітини епітелію дихальних шляхів також експресують велику кількість TLR^{21,22}, які допомагають їм підвищити адекватну відповідь на мікробний вплив. Активація TLR на епітеліальних клітинах залучена до регулювання експресії різноманітних генів, у тому числі тих, що кодують цитокіни, хемокіни і антимікробні пептиди.

Велика кількість бактеріальних, грибових і вірусних продуктів була ідентифікована як ліганди для різних TLR та інших рецепторів розпізнавання образів,^{23,24} що експресуються на клітинах епітелію дихальних шляхів.

¹⁹ Guilhemelli F., Vilela N., Albuquerque P. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2013. №4, p. 1–12.

²⁰ Cystic Fibrosis in Europe – Facts and Figures. The European Cystic Fibrosis Society, 2015.

²¹ Hartl D., Gaggar A., Bruscia E. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012. №11, p. 363–382.

²² Bals R., Hiemstra P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European respiratory journal*. 2004. №23, p. 327–333.

²³ Greene C.M., Carroll T.P., Smith S. G. TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. 2005. №174, p. 1638–1646.

²⁴ Gerritn J., Yildirim A. O., Rubin B.K. TLR-4-Mediated Innate Immunity Is Reduced in Cystic Fibrosis Airway Cells. *American journal respiratory cell molecular biology*. 2010. № 42, p. 424–431.

¹³ Zhang L., Parente J., Harris S. M. Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. № 49.

¹⁴ Guilhemelli F., Vilela N., Albuquerque P. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2013. № 4, P. 1–12.

¹⁵ Cystic Fibrosis in Europe – Facts and Figures. The European Cystic Fibrosis Society, 2015.

¹⁶ Makukh H., Křenková P., Tyrkus M. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: Genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010. № 9, P. 371–375

¹⁷ Hartl D., Gaggar A., Bruscia E. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012. № 11, P. 363–382.

¹⁸ Bals R., Hiemstra P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European respiratory journal*. 2004. № 23, P. 327–333.

Відомо, що TLR також регулюють експресію антимікробних пептидів. З'ясовано, що CD14, частина рецепторного комплексу TLR4 важлива в ЛПС-індукованій продукції hBD-2 в трахеобронхіальних епітеліальних клітинах. Згодом було з'ясовано, що TLR2 регулює експресію hBD-2 у відповідь на бактерійний ліпопротеїн в епітеліальних клітинах легені, і hBD-2 і IL-8, у відповідь на пептидоглікани і частки стіни клітини дріжджових грибів в людських кератиноцитах²⁵.

Було показано, що експресія hBD-2, hBD-3, hBD-4, LL-37 і декількох інших антимікробних пептидів стимулюється *in vitro* бактеріальними продуктами і запальними медіаторами. Ці дослідження клітинних культур підтверджуються декількома дослідженнями на пацієнтах, показуючи, що концентрація антимікробних пептидів, таких як b-дефензини, підвищується в різних рідинах біологічного походження під час запального або інфекційного процесу, як, наприклад, при пневмонії чи муковісцидозі²⁶.

Миші з видаленим cathelin-подібним антимікробним протеїном-18, зокрема щурячий гомолог LL-37, мають більш виражене інфікування після шкідливого введення бактерій. З іншого боку, надмірна продукція LL-37 за допомогою вірусного переносу гена призводить до збільшення вродженого захисту організму у бронхіальній ксенотрансплантатній моделі муковісцидозу і в щурячих тваринних моделях пневмонії і септичного шоку²⁷.

Використовуючи системи культури епітеліальних клітин дихальних шляхів від хворих на муковісцидоз, було продемонстровано, що отримані з епітеліальних клітин антимікробні пептиди можуть бути інактивовані високою концентрацією солі в поверхневому шарі рідини епітеліального шару.

Мутації у гені CFTR спричиняють критичне зниження вродженої захисної системи організму легень, що призводить до ранніх та тяжких форм хронічної хвороби дихальних шляхів, яка характеризується обструкцією, запальним процесом з нейтрофільним переважанням та бактеріальною інфекцією, в результаті яких прогресує ураження легень

²⁵ Patient registry annual data report. Cystic Fibrosis Foundation. 2016.

²⁶ Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*. 2000. № 1. p. 141–150.

²⁷ Bals R., J. Wilson. Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003. № 60.

з розвитком бронхоектазів, пневмофіброзу²⁸. У пацієнтів антибактеріальна активність поверхні дихальних шляхів знижується внаслідок високої міцності іонних зв'язків та прямої взаємодії АМП із ДНК та філаментним F-актином.

Зростаюча резистентність мікрофлори до антибіотиків, особливо в дихальних шляхах у хворих на МВ, вимагає нових підходів до антибіотикотерапії. Оскільки бактерії не розвивають резистентність до АМП, як, наприклад, до кателіцидину, АМП можуть бути ефективним лікувальним засобом.

Саме тому метою нашого дослідження було визначення вмісту антимікробного пептиду кателіцидину в сироватці крові дітей, хворих на муковісцидоз, залежно від важкості та періоду захворювання.

Матеріали та методи. Проведено комплексне клінічне та лабораторно-інструментальне обстеження 74 дітей віком від 2 місяців до 18 років, хворих на муковісцидоз.

Критерії включення:

- діти, хворі на муковісцидоз, віком до 18 років;
 - діти, хворі на муковісцидоз, в періоді загострення та в період ремісії;
 - діти, у яких діагноз муковісцидоз підтверджений двома позитивними потовими пробами, та/або виявлена мутація гена CFTR;
- Критерії виключення: діти з підозрою на муковісцидоз, який не підтверджений двома позитивними потовими пробами та/або виявленою мутацією гена CFTR.

Клініко-лабораторне обстеження дітей, хворих на муковісцидоз, проводили відповідно до Наказу МОЗ України №723 від 15.07.2016 р. «Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги хворим на муковісцидоз».

Діти були опитані на наявність скарг, був вивчений анамнез життя та захворювання, зібраний спадковий анамнез. Під час об'єктивного обстеження, яке проводили за загальноновизнаними методиками, враховували наявність та відсутність таких синдромів, як дихальна недостатність, задишка, тривалий вологий кашель, утруднення носового дихання, наявність в'язкого густого мокротиння, ціаноз,

²⁸ Cohen T., Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome / T. Cohen, // *Nat Med*. 2013. №18. p. 509–519.

затримка фізичного розвитку, втрата маси тіла, деформація пальців у вигляді «барабанних паличок», «годинникових скелець», частий зловонний стул, стеаторея, поліфекалія.

Вміст антимікробного пептиду LL-37 у сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором "Human LL-37 ELISA kit" (Husult Biotech, Нідерланди) у відповідності до інструкції фірми-виробника. LL-37 є антимікробним С-кінцевим пептидом катіонного антимікробного протейну людини hCAP-18 із родини кателіцидинів. У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до LL-37, додавали по 100 мкл стандартних розчинів (з концентраціями LL-37 – 0; 0,1; 0,4; 1,2; 3,7; 11; 33 та 100 нг/мл), 100 мкл проб (1:10), герметизували адгезивною плівкою, інкубували 60 хвилин при 25°C. Далі лунки 4 рази промивали буферним розчином, вносили 100 мкл біотинолових антитіл, інкубували 60 хвилин при 25°C. Далі лунки 4 рази промивали буферним розчином, вносили 100 мкл ензимного кон'югату (стрептавідин-пероксидази), перемішували, закривали лунки адгезивною плівкою. Інкубували 60 хв при 25°C для утворення на твердій фазі комплексу АГ-АГ-АГ-ензим. Лунки відмивали від надлишку нез'язаних реагентів, вносили в них по 100 мкл хромогенного субстрату. Перемішували, інкубували 15 хв при 25°C, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину у фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Чутливість набору < 0,1 нг/мл, коефіцієнт варіації – < 10%.

Проведений аналіз дітей основної групи за статтю та віком. За статтю обстежені діти розподілені, відповідно, на 45 хлопчиків (51,7 ± 5,35 %) та 42 дівчинки (48,3 ± 5,35 %).

Всі обстежені діти були розділені на наступні вікові групи: від 0 до 3 років – 19 (21,8 ± 4,43 %), від 4 до 6 років – 16 (18,4 ± 4,15 %), від 7 до 14 років 40 – (46,0 ± 5,34 %), від 15 до 18 років – 12 (13,8 ± 3,70 %). Середній вік обстежених становив 9,39 ± 0,535 років.

В якості контрольної групи обстежено 40 практично здорових дітей віком від 2 до 18 років (середній вік 9,20 ± 1,06 років), серед яких було 23 хлопчики (57,7 ± 10,3 %) та 17 дівчаток (42,5 ± 11,98 %). В контрольну групу включали практично здорових дітей за умов відсутності скарг та об'єктивних ознак спадкових і хронічних захворювань, без відхилень показників при клініко-лабораторних, інструментальних дослідженнях, із відсутністю гострих інфекційних

захворювань. У всіх дітей відзначались нормальні результати клініко-лабораторних та інструментальних досліджень.

Нашими дослідженнями було встановлено, що серед обстежених дітей переважала форма з панкреатичною недостатністю 84 дитини (96,6 ± 1,94 %), і лише 3 дитини (3,4%) не мали панкреатичної недостатності.

Проаналізувавши залежність перебігу захворювання від віку дітей, ми встановили, що важка форма муківіцидозу достовірно частіше зустрічається серед дітей 7–14 років (51,11 ± 5,36%), а діти молодшого віку хворіють здебільшого середньоважкою формою.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що у період загострення хвороби обстежено 67 дітей (77,0 ± 4,51 %), в ремісії – 10 (23,0 ± 4,51%).

Всім дітям для верифікації діагнозу було проведено потову пробу та ДНК аналіз мутації гену CFTR. Серед усіх мутацій 46,3% займає класична F508del/F508del, решта являються компаунд-гетерозиготами або гомозиготні за іншою мутацією. Аналіз мутацій за статтю показав, що хлопчики та дівчатка мають практично однаковий розподіл мутантних генів.

Визначення хлоридів поту у хворих на МВ є золотим стандартом діагностики захворювання. Так, за результатами нашого дослідження, потова проба у 51 пацієнта (87,9 ± 4,28 %) була позитивною, у 5 дітей (8,6 ± 2,86 %) – сумнівна та у 2 (3,4 ± 2,39 %) – негативна. Середнє значення проби становить 92,85 ± 3,17 мкмоль/л. Проаналізувавши результати потової проби залежно від важкості перебігу МВ, ми встановили, що 78,6 ± 5,39 % дітей із важкими перебігом мали позитивну потову пробу.

Результати дослідження. Встановлено, що вміст катіонного протимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові дітей хворих на МВ, достовірно відрізняється від значень у здорових дітей ($p \leq 0,001$) та характеризується підвищенням його рівня. Так, середній вміст кателіцидину LL-37 в сироватці групи дітей із МВ становив 4,73 ± 0,33 нг/мл, тоді як у групі контролю відповідний пептид у середньому склав 7,74 ± 0,27 нг/мл.

Результати визначення антимікробного пептиду кателіцидину у сироватці крові дітей, хворих на МВ, нами було розподілено на квартали. У I кварталі потрапили значення LL-37 нижче 18,90 нг/мл,

що склало 28,4% від усіх спостережень, II квартал – 18,91 – 25,60 нг/мл (23% спостережень), до II кварталу ввійшли показники 25,61 – 31,50 нг/мл (25,7%) та до IV кварталу віднесено значення вище 31,51 нг/мл (23,0 %) (рис. 1).

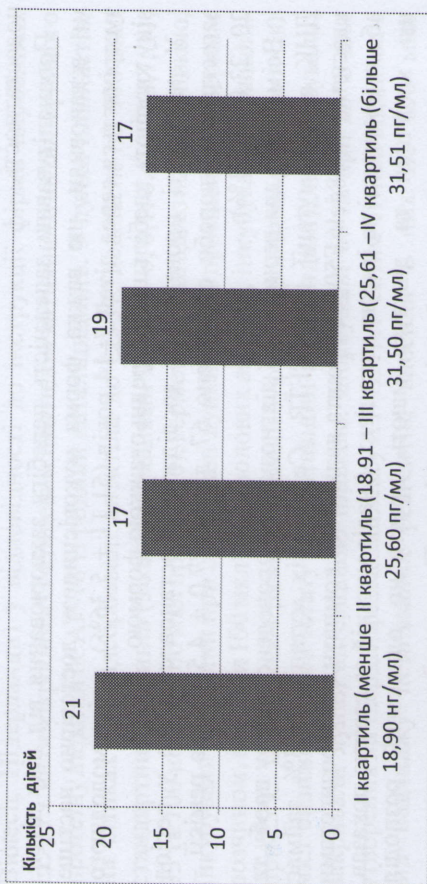


Рис. 1. Розподіл дітей, хворих на МВ, залежно від вмісту антимікробного пептиду кателіцидину

Оцінивши дані залежно від статі, достовірно різниці не виявлено. Так, у 38 хлопчиків, яким визначали рівень LL-37, середній показник становив $25,004 \pm 1,37$ нг/мл, у дівчаток дещо менший – $24,86 \pm 1,42$ нг/мл відповідно.

Проаналізувавши отримані дані, залежно від періоду захворювання, з'ясовано, що середнє значення LL-37 в періоді загострення та ремісії практично не відрізнялось та становило відповідно $24,9 \pm 0,98$ та $25,06 \pm 2,76$, однак достовірно відрізнялось від групи здорових дітей у сторону підвищення (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст антимікробного пептиду кателіцидину LL-37 в сироватці крові дітей, хворих на МВ, залежно від періоду захворювання

	Загострення		Ремісія	
	n	M±m	n	M±m
25(OH)D, нг/мл	57	$24,9 \pm 0,98^*$	20	$25,06 \pm 2,7^*$
Здорові діти	$7,74 \pm 0,27$			

Примітка: * – $p \leq 0,001$ – різниця вірогідна відносно показників здорових дітей

Залежність між рівнем кателіцидину у дітей, хворих на МВ, та ступенем важкості нами не виявлена. Так, серед хворих із середньоважким перебігом в середньому рівень кателіцидину склав $24,46 \pm 1,69$ нг/мл, із важким – $25,27 \pm 1,21$ нг/мл. Але хворі на МВ діти із важким і середньоважким перебігом мали достовірно вищі значення кателіцидину LL-37 порівняно з групою здорових дітей ($p \leq 0,001$) (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст антимікробного пептиду кателіцидину LL-37 у сироватці крові дітей, хворих на МВ, залежно від важкості захворювання

	Середньоважкий перебіг		Важкий перебіг	
	n	M±m	n	M±m
LL-37, нг/мл	31	$24,498 \pm 1,69^*$	43	$25,28 \pm 1,22^*$
Здорові діти	$7,74 \pm 0,27$			

Примітка: * – $p \leq 0,001$ – різниця вірогідна відносно показників здорових дітей.

ВИСНОВКИ

У дітей, хворих на муковісцидоз, відмічається значне підвищення антимікробного пептиду кателіцидину в сироватці крові, порівняно із групою здорових дітей. Так, середнє значення кателіцидину у пацієнтів з муковісцидозом у 3,16 рази перевищувало значення здорових пацієнтів. Було показано, що вміст кателіцидину не залежить від статі хворих дітей. Проведений аналіз вмісту LL 37 залежно від періоду та важкості захворювання показав, що даний пептид однаково підвищений у всіх хворих та достовірно відрізняється від групи контролю. Діагностична чутливість тесту складає 71,62%, діагностична специфічність тесту складає 77,5%.

АНОТАЦІЯ

Стаття присвячена вивченню ролі антимікробних пептидів у захисті респіраторного тракту у дітей, хворих на муковісцидоз. Визначені основні механізми неспецифічного захисту поверхні дихальних шляхів від бактеріальних та вірусних агентів у здорових та хворих на муковісцидоз дітей, та роль у цьому антимікробних пептидів. Обговорюються механізми антимікробної дії антимікробного пептиду кателіцидину та можливі шляхи розробки та застосування пептиду як протимікробного засобу у пацієнтів із муковісцидозом. У роботі наведені результати визначення антимікробного пептиду кателіцидину LL 37 у сироватці крові дітей, хворих на муковісцидоз, та проаналізовано його вміст залежно від періоду та важкості хвороби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*. 2000. № 1. p. 141–150.
2. Bals R., Hiemstra P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European respiratory journal*. 2004. № 23. p. 327–333.
3. Balsa R., J. Wilson. Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003. № 60.
4. Cohen T., Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 2013. № 18. p. 509–519.
5. Cystic Fibrosis in Europe – Facts and Figures. The European Cystic Fibrosis Society. 2015.
6. Cystic Fibrosis Life Expectancy. Cystic fibrosis news today. 2016. URL: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/cystic-fibrosis-research/>.
7. Gerritt J., Yildirim A.O., Rubin B.K. TLR-4-Mediated Innate Immunity Is Reduced in Cystic Fibrosis Airway Cells. *American journal respiratory cell molecular biology*. 2010. № 42. p. 424–431.
8. Greene C.M., Carroll T.P., Smith S. G. TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. 2005. № 174. p. 1638–1646.
9. Guilhemelli F., Vilela N., Albuquerque P. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2013. № 4. p. 1–12.

10. Hartl D., Gaggar A., Bruscia E. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012. № 11. p. 363–382.
11. Makukh H., Křenková P., Tyrkus M. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: Genotype–phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010. № 9. p. 371–375.
12. Patient registry annual data report. Cystic Fibrosis Foundation. 2016.
13. UK Cystic Fibrosis Registry 2015 Annual Data Report. 2016.
14. Zhang L., Parente J., Harris S. M. Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. № 49.

Information about authors:

Dudnyk V. M.,

Doctor of Medical Science, Professor

Head of Department of Pediatrics № 2

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University

56, Pirogov str., Vinnitsya, 21018, Ukraine

Demianyshyna V. V.,

Postgraduate student

Department of pediatrics № 2

Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University

56, Pirogov str., Vinnitsya, 21018, Ukraine